

氏 名	千葉 壮太郎
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学 術
学位授与番号	博甲第3620号
学位授与の日付	平成20年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科資源管理科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i> の病原性関与遺伝子の分子生物学的研究
論文審査委員	教授 鈴木 信弘      教授 積木 久明      准教授 金原 和秀

### 学位論文内容の要旨

テンサイそう根病 (rhizomania) の病原ウイルス *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV : ビートえそ性葉脈黄化ウイルス : *Benyvirus* 属) は、通常4種の分節型プラス鎖RNA (RNA1-4) をゲノムに持つ棒状ウイルスであり、ネコブカビ類 *Polymyxa betae* によって土壌伝染される。本研究では、病徴発現に必須とされるp25遺伝子 (RNA3) およびRNAサイレンシングのサプレッサーとされるp14遺伝子 (RNA2) に注目して、それぞれの遺伝子の分子機構について解析を行った。

BNYVV RNA3にコードされるp25領域に人為的に変異を導入して病原性検定を行った結果、病原性を維持するためには、p25の全領域が必要であることが確認された。p25タンパク質に存在する8個のシステイン残基のうち、79、84および90番目のシステインは病原性の維持に重要であることがわかった。p25遺伝子は感受性テンサイでは病徴発現に、抵抗性テンサイでは抵抗性反応にも関与していることから、野生ビート (*B. vulgaris* subsp. *maritima*) MR0, MR1, MR2を指標植物に用いて解析を行い、抵抗性誘導に必要な3個のアミノ酸残基を同定した。すなわち、p25タンパク質の68番目のアミノ酸がMR1ではフェニールアラニン、MR2ではフェニールアラニン、チロシンまたはヒスチジンであること、さらにいづれも70番目がグリシン、179番目がアスパラギンであることが抵抗性反応の誘導に重要であることが明らかにされた。とりわけ68番目のアミノ酸の変異により品種抵抗性が打破されている可能性が示唆された。PVX ベクター、GFP標識ウイルスを用いて、p25遺伝子の抵抗性反応の機構を解析したところ、p25遺伝子は宿主特異的にウイルスの移行を阻害していることが判明した。

BNYVV RNA2にコードされるp14タンパク質がRNAサイレンシングのサプレッサー活性をもつことが、GFP形質転換 *N. benthamiana* (16c) を用いたパッチテストにより証明された。p14タンパク質の小核と細胞質への局在性を明らかにし、小核移行シグナルを同定した。しかし、小核移行性とサイレンシングサプレッサー活性とは無関係であった。p14タンパク質に存在する9個のシステイン残基についてアラニンスキャニング解析を行い、p14タンパク質の立体構造に必要なシステイン残基を同定した。Yeast-two-hybrid法によりp14タンパク質の2量体形成を確認した。

## 論文審査結果の要旨

テンサイそう根病 (rtizomania) の病原ウイルス *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) は通常 4 種の分節型プラス鎖 RNA (RNA1-4) をゲノムに持つ棒状ウイルスであり、ネコブカビ類 *Polymyxa betae* によって土壌伝染される。千葉氏は、病徴発現に必須とされる p25 遺伝子 (RNA3) および RNA サイレンシング (宿主防御機構) のサプレッサーとされる p14 遺伝子 (RNA2) の分子生物学的解析を行い以下の成果をあげた。

P25 が病原性を維持するためには、p25 の全領域が必要であり、p25 タンパク質に存在する 8 個のシステイン残基のうち、79、84 および 90 番目のシステインは病原性の維持に重要であることを示した。p25 遺伝子は感受性テンサイでは病原発現に、抵抗性テンサイでは抵抗性反応にも関与していることから、野生ビート (*B. vulgaris* subsp. *Maritima*) MRO, MR1, MR2 を指標植物に用いて解析を行い、抵抗性誘導に必要な 3 個のアミノ酸残基 (68, 70, 179) を同定した。特に 68 番目のアミノ酸の変異により品種抵抗性が打破されている可能性が示唆された。PVX ベクター、GFP 標識ウイルスを用いて、p25 遺伝子の抵抗性反応の機構を解析したところ、p25 遺伝子は宿主特異的にウイルスの移行を阻害している可能性が示された。

一方、BNYVV p14 タンパク質が RNA サイレンシングのサプレッサー活性をもつことが、GFP 形質転換 *N. benthamiana* (16c) を用いたパッチテストにより明らかにした。p14 欠失変異ウイルスは病原性、複製能が極度に低下し、p14 が宿主防御反応である RNA サイレンシングを抑制することを指示する。また、p14 タンパク質の小核と細胞質への局在性を明らかにし、核小体移行シグナルを同定した。しかし、核小体移行性とサイレンシングサプレッサー活性の間に相関は認められなかった。

以上のように、生物学にとって重要な宿主-病原体相互作用の分子解明に新しい手がかりを、また応用的には抵抗性品種開発に貢献できる重要な情報を提供する。

千葉氏は博士号に値する上記のような十分な研究成果を挙げ、またその過程で十分な研鑽を積んだことを学位論文審査員として認める。